

한국에서 분리한 *Agrobacterium tumefaciens* T7의
특성과 biovar. 결정

이 윤 · 김창진 · 김성훈 · 유익동 · 민태익

한국과학기술원 유전공학센터

Characterization and biovar. Determination of
Agrobacterium tumefaciens T7 isolated in Korea

Lee, Y., C.H. Kim, S.H. Kim, I.D. Yoo, and T.I. Mheen

Genetic Engineering Center, KAIST, Seoul, Korea

ABSTRACT: For the purpose of securing of strains which can be usefully utilized to study symbiosis between *Rhizobium* and legume plant, *A. tumefaciens* T7 was isolated and characterized and then subgroup biovar was determined. *A. tumefaciens* T7 induced smooth tumor like nopaline type one and did not grow at 37°C and in the presence of 2% NaCl on yeast extract mannitol medium. The strain was able to grow on the New and Kerr selective media and utilize erythritol but not phenylalanine, tryptophan, and tartarate as a sole carbon source. Negative results were obtained from 3-keto-lactose production and oxidase test. The strain produced alkali from malonate and citrate and showed acid litmus milk reaction. At least two large plasmids were detected in the cell lysate. According to all of these results, it could be concluded that subdivision of isolated strain was biovar 2.

KEY WORDS □ *Agrobacterium tumefaciens*, biovarz, 3-ketolactose, large plasmid.

Agrobacterium 은 *Rhizobium* 과 함께 *Rhizobiaceae* 과에 속하는 토양미생물의 일종으로 쌍자엽식물과 일부 겉씨식물에 crown gall을 형성, 식물세포의 비정상적인 성장을 유도하여 식물의 생장이나 영양을 저해하는 특성을 가지고 있다 (Drummond 1979).

특히 *Agrobacterium* 은 Ti plasmid라 불리는 종양유도성 plasmid를 가지고 있으며 이 Ti-plasmid에 존재하는 DNA의 일부를 식물체의 genome에 전이시켜 식물호르몬의 균형을 파괴함으로써 식물세포가 제어를 받지 않고 분열을 계속하여 종양을 유도한다고 밝혀졌다(Braun 1958, Watson et al. 1975). 동시에 식물종양세포에서 합성 분비되는 아미노산의 변형체인 opine을 분해하여 탄소원으로 이용하는 생태학적인 이점도 가

지고 있다(Kahl 1982). 또한 현재에는 *Agrobacterium* 의 Ti-plasmid중의 T-DNA가 식물세포의 genome에 전이되면서 그 기능이 복제, 발현된다는 성질을 이용하여 식물세포에 유용 유전자를 도입시키기 위한 vector로써 이용하려는 시도가 활발히 진행되고 있고(Heokema et al. 1983, Pierson et al. 1986) 이미 Prakash et al. (1982) 및 Kahl et al.(1982) 등에 의해서 octopine형 및 nopaline형 Ti-plasmid의 유전자 지도까지 작성보고되고 있다.

한편 *Agrobacterium* 은 *Rhizobium* 과 유사한 성질을 가지고 있기 때문에 *Rhizobium* 이 가지고 있는 Sym plasmid를 *Agrobacterium* 에 형질전환시켜 근류형성능 및 질소고정능을 조사하는 등 *Rhizobium* 과 두과작물 사이의 근류형성 과정을

연구하는 방편으로도 유용하게 이용되고 있다 (Hooykass 1981.)

본 연구에서는 이상과 같은 특징을 이용하여 *Rhizobium*-두과작물간의 공생관계를 해명하는 데 유용하게 이용될 균주를 확보할 목적으로 야생식물의 뿌리에 형성된 tumor로부터 *Agrobacterium*을 분리하여 생리·생화학적 특성을 조사한 후 subgroup인 biovar를 결정하였고 crown gall의 형태적 특성과 plasmid의 존재 유무등을 확인하였다.

재료 및 방법

*Agrobacterium*의 분리 및 tumorigenesis test

야생식물의 뿌리에 형성된 tumor를 수집한 다음 5% hypochlorite 용액으로 표면을 잘 세척하고 0.1% HgCl₂ 및 70% ethanol로 약 3분간씩 차례로 표면살균 하였다. 그후 멸균수를 이용하여 다시 세척하고 tumor를 무균적으로 절단, yeast extract-mannitol 배지(YM)에 이식한 후 28°C에서 배양하며 single colony를 분리하였다.

분리선발된 균주의 tumor형성능을 확인하기 위하여 *Kalanchoe daigremontiana*를 숙주로 사용하였다. 즉 숙주식물의 잎과 줄기 표면을 70% (v/v) ethanol로 세척, 소독한 후 멸균된 칼로 표면에 상처를 내고 상처부분에 식물 tumor로부터 분리한 균주 배양액을 접종하여 tumor형성능을 관찰하였다.

사용균주 및 배지

대조균주는 Dr. Schilperoort, R.A.로부터 *Agrobacterium tumefaciens* C 58 및 *Agrobacterium tumefaciens* Ach5를 분양받아서 사용하였으며 사용한 모든 균주는 YM배지를 이용하여 배양하였다.

탄소원 이용성조사

분리한 균주는 YM배지에서 배양한 후 basal medium(White 1972)으로 2회 씻어낸 다음 당이나 아미노산 등의 탄소원이 0.1%(w/v) 함유된 basal agar 배지에서 배양하였고 control 배지로는 탄소원대신 증류수를 사용하여 28°C에서 10일간 배양하며 탄소원의 이용유무를 판정하였다. 사용한 탄소원은 adonitol, L-arabinose, cel-

lobiose, erythritol, D-fructose, D-glucose, lactose, maltose, mannitol, phenylalanine, L-rhamnose, sucrose, tartarate, trehalose, tryptophan, D-xylose 등이었다.

선발배지에서의 성장조사

Subgroup biovar 1 균주의 선택배지로는 Schroth *et al.* (1965) 배지를 사용하였고 subgroup biovar 2 균주의 선택배지로는 New와 Kerr(1971)배지를 사용하여 성장여부를 판단하였다. 또한 octopine 이용성 조사를 위하여 K₂HPO₄ 10, 5g, KH₂PO₄ 4, 5g, MgSO₄ · 7H₂O 0, 2g, CaCl₂ 10mg, FeSO₄ 5mg, MnCl₂ 2mg/l의 agar 배지에 octopine 1mg/l를 첨가하여 사용하였다(Kerr *et al.* 1977).

생화학적 특성조사

선발균주의 생화학적 특성을 조사하기 위하여 3-ketolactose production, citrate 및 malonate 이용성, litmus milk 반응, oxidase test 등을 실시하였다(Bernaerts *et al.* 1963, Smibert *et al.* 1981).

Plasmid 조사

Plasmid의 확인은 Kado와 Liu(Kado *et al.* 1981)의 방법을 변형하여 이용하였다. 즉 YM배지에서 배양한 배양액 100 μl를 eppendorf tube에 취한 후 원심분리하고 Ebuffer(40mM Tris, 5mM Na-acetate, 1mM Na₂-EDTA, pH 7.9)로 수회 씻어낸 후 100 μl Ebuffer에 현탁시켰다. 여기에 알카리용액(Tris · OH 50mM, SDS 3%, 2N NaOH 1.6ml/100ml) 200 μl를 넣어 가볍게 여러번 뒤집어 섞어주면서 lysis 시켰다. 이 용액을 60°C에서 20분간 열처리하고 2M Tris(pH 7.0) 10 μl를 가하여 잘 섞어준 후 phenol/chloroform 용액을 처리하고 원심분리한 후 상층액을 취하여 vertical agarose gel electrophoresis(0.7%)를 수행하여 plasmid의 유무를 확인하였다.

실험결과 및 고찰

선발 *Agrobacterium* 균주의 tumorigenesis test 및 tumor morphology.

Rhizobium—두과작물간의 공생관계를 해명하



Fig.1. Tumor morphology produced by isolated Agrobacterium.

a: A. tumefaciens Ach5 b: A. tumefaciens T7 c: A. tumefaciens C58

는데 유용한 *Agrobacterium* 을 선발할 목적으로, 야생의 식물뿌리에 형성된 tumor로부터 수종의 균을 분리한 후 숙주식물인 *Kalanchoe daigremontiana* 에 재차 접종하여 crown gall 형성 여부를 관찰한 결과, Fig.1과 같이 hairy root disease 가 아닌 tumor 를 형성함이 관찰되어 이 균주를 *Agrobacterium tumefaciens* T7이라 명명하였다.

이 *A. tumefaciens* T7에 의해 형성된 tumor 는 Fig.1에서와 같이 *A. tumefaciens* C58 균주에 의해 형성된 tumor 와 동일한 smooth tumor 를 형성하였다. 기존의 보고(Kahl et al. 1982)에 의하면 *Agrobacterium* 은 crown gall 의 morphology 에 따라 rough tumor 를 형성하는 균주는 octopine 형으로써 octopine 을 유일한 탄소원과 질소원으로 이용할 수 있으며, smooth tumor 를 형성하는 균주는 nopaline 형으로써 nopaline 을 탄소원 및 질소원으로 이용한다고 보고하고 있는데 본 연구에서 분리한 균은 smooth tumor 를 형성하고 있어 nopaline 형의 균주인 것으로 추정되었다.

또한 octopine 의 이용성 여부를 조사한 결과 (Table 1)에서도 *A. tumefaciens* Ach5 균주는 octopine 을 이용하며 rough tumor 를 형성함에 비하여 *A. tumefaciens* C58 및 T7 균주는 octopine 을 이용치 못하며 smooth tumor 를 형

성하여 상기의 결과를 뒷받침 해주고 있었다. 그러나 nopaline 은 입수가 곤란하여 *A. tumefaciens* T7 균주의 nopaline 이용성 여부를 확인하지 못하였기 때문에 agropine 형일 가능성을 전혀 배제할 수 없었다.

한편 *A. tumefaciens* T7 균주의 biovar 를 결정하기 위하여 *A. tumefaciens* C58 균주를 대비로 하여 탄소원 이용성 및 생리, 생화학적 특성을 조사하였다.

탄소원 이용성

즉 선발된 *A. tumefaciens* T7 균주의 탄소원 이용성 여부를 조사하기 위하여 유일한 탄소원으로 각종 당 및 아미노산을 공시하여 그 이용성 여부를 조사하였다(Table 2).

그 결과 *A. tumefaciens* T7 균주는 adonitol, L-arabinose, cellobiose, erythritol, D-fructose, D-glucose, lactose, maltose, mannitol, L-rhamnose, sucrose, trehalose, D

Table 1. Relationship of tumor morphology and octopine utilization.

Strain	Utilization of octopine	Tumor morphology
C 58	-	smooth
Ach 5	+	rough
T 7	-	smooth

Table 2. Utilization of several organic compounds as a sole carbon source by the isolated strain.

Organic compound	C 58	T 7
Adonitol	+	+
L-Arabinose	+	+
Cellobiose	+	+
Erythritol	-	+
D-Fructose	+	+
D-Glucose	+	+
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Mannitol	+	+
Phenylalanine	-	-
L-Rhamnose	+	+
Sucrose	+	+
Tartarate	-	-
Trehalose	-	+
Tryptophan	-	-
D-Xylose	+	+

-xylose 등 대부분의 당을 유일한 탄소원으로 이용하였으나 phenylalanine, tryptophan, tartarate 는 이용하지 못하였다. 그러나 대조구로 공시한 biover 1인 *A. tumefaciens* C58 균주는 T7 균주와 대부분은 유사한 탄소원 이용성을 나타냈으나 erythritol 은 이용하지 못하였다. 이상의 결과는 biovar 1에 속하는 균주는 erythritol 을 이용하지 못하는 반면 biovar 2는 erythritol 을 유일한 탄소원으로 이용할 수 있다는 Jordan(1984)의 보고와 비교하였을 때 *A. tumefaciens* T7 균주는 subgroup 이 biovar 2임을 시사한다고 하겠다.

생리적 특성

한편 *A. tumefaciens* T7 균주는 YM배지 28°C 에서는 양호한 성장을 보였으나 37°C 및 2% NaCl 농도에서는 성장하지 못하는 반면 *A. tumefaciens* C58 균주는 37°C 및 2% NaCl 농도에서도 양호한 성장을 나타내 subgroup 이 다른것을 알 수 있었다. 또한 biovar 를 결정하기 위한 biovar 1의 선별배지인 schroth 배지(1965) 및 biovar 2 선별배지인 New 와 Kerr 배지(1971)를 이용하여 각 균주의 성장정도를 조사한 결과 Table 3과 같이 schroth 배지를 이용한 경우에는 *A.*

Table 3. Differential growth ability of the isolated strain in the selective medium and several environmental conditions.

Characteristics	Strains	
	C 58	T 7
Growth;		
At 28°C on YM medium	+	+
At 37°C on YM medium	+	-
On the selective medium of Schroth et al.	+	-
On the selective medium of New and kerr.	-	+
In the presence of 2% NaCl.	+	-

tumefaciens C58 균주만이 성장하였고 New 와 Kerr 배지에서는 *A. tumefaciens* T7 균주만이 양호한 성장을 나타내었다. 한편 biovar 3는 New 와 Kerr 선별배지에서는 성장할 수 없으므로 이상의 결과들로 미루어 본 연구실에서 선별한 *A. tumefaciens* T7 균주는 biovar 2 group임을 확인하였다.

생화학적 특성

선별된 *A. tumefaciens* T7 균주의 생화학적 특성을 조사하여 Table 4에 나타내었다.

Lactose 를 3-ketolactose 로 산화시키는 생화학적 반응에 대한 실험은 biovar 1과 biovar 2를 구분하기 위한 간단하면서도 이주 특이한 진단 방법으로 사용되는데 상기에서 얻어진 결과를 확인하기 위하여 3-ketolactose 생성여부를 조사하였다. 그 결과 biovar 1인 *A. tumefaciens* C58 균

Table 4. Biochemical characteristics of the isolated strains.

Charateristics	Strains	
	C 58	T 7
Production of 3-ketolactose	+	-
Formation of Alkali from:		
Na · Malonate	-	+
Simmons citrate	-	+
Reaction in litmus milk : Alkaline	+	-
Acid	-	+
Oxidase test:Method of Kovacs	+	-

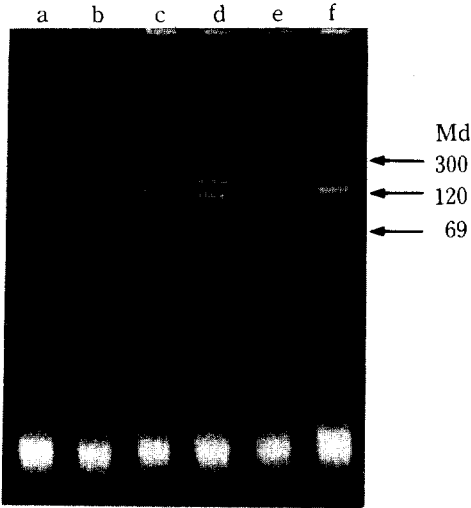


Fig.2. Resolution of high molecular weight plasmids of *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp

- a. *R. japonicum* USDA 191
- b. *R. japonicum* R 271
- c. *R. phaseoli* 8401
- d. *A. tumefaciens* T7
- e. *R. japonicum* R247
- f. *A. tumefaciens* C58

주는 확연하게 3-ketolactose 생성반응을 보여주었으나 *A. tumefaciens* T7은 전혀 3-ketolactose를 생성하지 못하였다. 또한 *A. tumefaciens* T7균주는 malonate와 citrate를 이용하여

alkali 반응을 나타냈으며 litmus milk 반응은 acid 반응을 나타냈다. 또 Kovacs법(Smibert *et al.* 1981)을 이용한 oxidase test도 음성반응을 나타내어 *A. tumefaciens* C58균주와는 상이한 결과를 보였다.

한편 biovar 3 group은 litmus milk 반응에서 alkali 반응을 나타내는 특성이 있음에 비하여 본 선발균주는 acid 반응을 나타내, 앞서 실험한 선별배지에서의 성장조사 결과들과 함께 고찰하여 biovar 3가 아님을 확인할 수 있었다. 따라서 이성과 같은 특성들로부터 *A. tumefaciens* T7이 subgroup biovar 2에 속하는 균주라고 판단되었다.

Large plasmid의 확인

*A. tumefaciens*에 의한 tumor 형성은 Ti-plasmid라 불리는 large plasmid에 존재하는 유전자가 식물세포의 genome에 전이하여 유도되는데 유전적 연구를 위하여는 이와같은 plasmid를 분리 확인할 필요가 있다. 따라서 *A. tumefaciens* T7균주의 plasmid 유무를 조사한 결과 Fig.2와 같이 2개의 large plasmid가 관찰되었다. 이들 2개의 plasmid의 분자량은 대개 100 Md 및 150 Md 정도로 추정되었으며 그 중 어느 plasmid가 tumor 형성에 관여하는지는 현재 조사중이다.

적 요

Rhizobium—두과식물간의 공생관계를 해명하기 위하여 유용하게 이용한 균주확보를 목적으로 *Agrobacterium tumefaciens* T7균주를 분리하여 생리·생화학적 특성조사 및 subgroup인 biovar를 결정하였다. 분리 선발한 *A. tumefaciens* T7균주는 nopaline형 smooth tumor를 형성하였고 yeast extract mannitol 배지상에서 37℃와 2% NaCl 농도하에서는 성장하지 못하였으며 New와 Kerr 선별배지에서 양호한 성장을 나타냈다. 또 erythritol을 포함한 대부분의 탄소원은 잘 이용하였으나 phenylalanine, tryptophan, tartarate 등을 이용하지 못하였다. 한편 3-ketolactose와 oxidase 생성은 인정되지 않았고 malonate와 citrate로부터 alkali를 형성하였으며 acid litmus milk 반응을 보여주었다. 또 분리 선발한 균주는 분자량 100~150Md의 large plasmid 2개를 가지고 있는 것이 확인되었다. 이상의 결과들로 본 연구실에서 선발된 균주는 nopaline형 *A. tumefaciens* biovar 2 T7균주로 판단되었다.

REFERENCES

1. Bernaerts, M.J. and De J.Ley, 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* 197, 406-407.
2. Braun, A.C., 1958. A physiological basis for autonomous growth of the crown gall tumor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 44, 344-349.
3. Drummond, M., 1979. Crown gall disease.

- Nature* **281**, 343-346.
4. Heokema, A., P.R. Hirsch, P.J.J. Hooykaas, and R.A. Schilperoort, 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of *A. tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179-180.
 5. Hooykaas, P.J.J., A.A.N. Brussel, H.D. Dulk-Ras, G.M.S. Sologferen, and R.A. Schilperoort, 1981. Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different *Rhizobium* species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **291**, 351-354.
 6. Jordan, D.C., 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1 ed. by Krieg, N.R. William and Wilkins, Baltimore, pp.234-254.
 7. Kado, C.I. and S.T. Liu, 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J. Bacteriol.* **145**, 1365-1373.
 8. Kahl, G. and J.S. Schell, 1982. *Molecular biology of plant tumors*. Academic Press, N.Y.
 9. Kerr, A., P. Manigault, and J. Tempe, 1977. Transfer of virulence in vivo and in vitro in *Agrobacterium*. *Nature* **265**, 560-561.
 10. New, P.B. and A. Kerr, 1971. A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 233-236.
 11. Pierson, P.E., T.J. Schaeffer, M.S. Wright, E.L. White, M.A. Hinchee, R.E. Mcdonnell, and M.G. Carnes, 1986. In vitro transformation of soybean, *Glycine max*(L) Merrill, using *A. tumefaciens*. IV International congress of plant tissue and cell culture. *The International Association for Plant Tissue Culture*. p.128.
 12. Prakash, R.K. and R.A. Schilperoort, 1982. Relationship between Nif plasmids of fast-growing *Rhizobium* species and Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **149**, 1129-1134.
 13. Schroth, M.N., J.P. Tompson, and D.C. Hildebrand, 1965. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*-*A. radiobacter* group from soil. *Phytopathology* **55**, 645-647.
 14. Smibert, R.M. and N.R. Krieg, 1981. General characterization in: *Manual of Methods for General Bacteriology*. ed. by P. Gerhardt *et al.* American Society for Microbiology, Washinton.
 15. Watson, B., T.C. Currier, M.P. Gordon, M.D. Chilton, and E.W. Nester, 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **123**, 255-264.
 16. White, L.O., 1972. The taxonomy of the crown gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 565-574.

(Received Jan. 7, 1987)